

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Permisibilidad de cultivos celulares secundarios de
alpaca y llama a multiplicación viral de herpesvirus
bovino, virus de la diarrea viral bovina, virus
parainfluenza 3 bovina y virus respiratorio sincitial
bovino**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Manuel Rodolfo Sánchez Salazar

Lima – Perú

2006

A mis padres, Manuel y Flor; a mis hermanos Renato y Vanessa. Por que sin ellos simplemente no seria nada.

A mis abuelos, tíos y primos. Por su cariño y constante aliento.

A mi abuelo Manuel Sánchez Quispe, por sus constantes consejos.

A quienes contribuyeron directamente en la realización de esta tesis, a los doctores Hermelinda Rivera, Alberto Manchego, Nieves Sandoval, Rosa Perales, Mariluz Arainga. Al Sr. Ricardo Ibáñez y Sra. Guadalupe Mamani. A mis amigos Rocío Ramírez, Roberto Prieto, Katherine Portilla, Mercy Ramírez, Susana Cachata, Juan Carlos Huamàn, Rubén Villacaqui. Muchas gracias por su valioso apoyo.

A mis amigos Gonzalo Vallenas, Otto Zea, Eduardo Sal y Rosas, Eben Salinas, Joana Ramos, Walter Paredes, Karina Vidal, Rubén Mallaopoma, Nino Arias; Quienes me brindaron su amistad, la cual valoraré por toda la vida.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
Lista de cuadros	
Lista de figuras	
I. Introducción	1
II. Revision bibliografica.	3
A. La técnica de cultivo de tejidos	3
B. Agentes virales causantes de cuadros respiratorios y reproductivos	6
1.-Virus de la Diarea Viral Bovina	6
2.-Virus Herpes Bovino tipo 1	9
3.-Virus Respiratorio Sincitial Bovino	14
4.-Virus Parainfluenza 3	17
III. Materiales y métodos	20
A.- Establecimiento de cultivos celulares secundarios de alpaca y llama	20
1.-Obtención de fetos de Alpacas y Llamas	20
2.-Establecimiento de cultivo Primario	20
3.-Establecimiento de cultivos secundarios	22
B.- Ensayos de permisibilidad de cultivos celulares	23
C.-Observación y evaluación de las monocapas inoculadas	24
1.-Determinación de Cambios Citopatogénicos	24
2.-Detección de antígenos virales	25
IV. RESULTADOS	26
V. DISCUSIÓN	34
VI.CONCLUSIONES	41
VII. LITERATURA CITADA	42

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas virales y tipo celular utilizados.....	27
Cuadro 2. Caracterización de ECP en cultivos celulares.....	28
Cuadro 3. Tiempo transcurrido a la presentación de ECP según tipo celular.....	29

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Obtención de órganos de feto de alpaca para la realización de los explantes primarios.....	21
Figura 2.- Células infectadas con Virus Parainfluenza Bovina 3.....	30
Figura 3. Células infectadas con Herpevirus Bovino tipo 1.....	31
Figura 4. Células infectadas con Virus respiratorio Sincitial Bovino.....	32
Figura 5. Células infectadas con Virus de la Diarrea Viral Bovina.....	33

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio fue determinar la permisibilidad de los cultivos celulares secundarios de alpaca y llama a la infección por distintos agentes virales de conocida seroprevalencia en este tipo de ganado. Se establecieron dos líneas celulares de cornete nasal y piel de alpaca y llama infectándose con Virus de la diarrea viral bovina (VDVB), Virus Herpes Bovino tipo 1 (VHB-1), Virus respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) y Virus Parainfluenza bovino tipo 3(VPI-3). Se determinó y caracterizó la presentación de efectos citopatogénicos (ECP) por medio de microscopia óptica de las monocapas teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE). Se confirmó la presencia de antígenos virales por medio de la prueba de Inmunofluorescencia Directa (IF). Los cultivos celulares secundarios de piel y cornete nasal de llama y alpaca fueron permisibles a la infección de los distintos virus, presentando los ECP característicos de cada uno de ellos. Esto demuestra que las células de alpaca y llama cultivadas *in vitro* presentan receptores homólogos a los presentes en células bovinas y determina que este tipo de cultivos es un modelo apropiado para ensayos de infección viral.

Palabras claves: alpacas, llamas, líneas celulares, permisibilidad, Virus de la diarrea viral bovina (VDVB), Virus Herpes Bovino tipo 1 (VHB-1), Virus respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) y Virus Parainfluenza bovino tipo 3(VPI-3), Efectos citopatogénicos (ECP).

SUMMARY.

In order to determine the permissibility of alpaca and llama cell cultures to infection by various viral agents of known seroprevalence, nasal turbinate and skin cell lines of alpaca and llama were established and infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1), Bovine respiratory Sincitial Virus (BRSV) and Bovine Parainfluenza Virus type 3 (BPIV-3). Presentation of citopathogenic effect (CPE) was determined and characterized by optical microscopy of Hematoxilin-Eosine stained monolayers. The presence of viral antigen was confirmed by Direct Immunofluorescence. Every cell line was permissible to infection with the four viral strains, showing the characteristic CPE. These results prove that alpaca and llama cells cultured *in vitro* show homologue receptors to those found in bovine cells and determine that these type of cultured cells represent an appropriate model for viral infection assays.

Keywords: alpaca, llama, cell lines, permissibility, Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV), Bovine Herpes Virus type 1 (BHV-1), Bovine respiratory Sincitial Virus (BRSV) and Bovine Parainfluenza Virus type 3 (BPIV-3), Citopathogenic effect (CPE).

I. INTRODUCCION

Los lamoides, donde se incluyen Guanacos (*Lama guanicoe*), Llamas (*Lama glama*), Alpacas (*Lama pacos*) y Vicuñas (*Vicugna vicugna*) son especies indígenas de Sud América. La domesticación de las Llamas y Alpacas debe haber ocurrido hace 5500 ó 6000 años (Wheeler, 2003).

En muchas zonas altoandinas, la crianza de Camélidos Sud Americanos (CSA) es una actividad muy importante en la economía de los pobladores pues representa la posibilidad de transformar recursos relativamente baratos como los pastos y su mano de obra, en recursos de mayor valor como animales de reproducción, carne, fibra, abono y animales de carga. Los CSA cumplen además un rol irremplazable en la relación cultural y social de los pueblos andinos.

El 85% de la producción de camélidos sudamericanos se encuentra en mano de las comunidades campesinas, donde el sistema de crianza es mixto, incluyendo también especies rumiantes de origen europeo. La falta de medidas de prevención y control de enfermedades propios de este sistema de crianza se refleja en los altos niveles de mortalidad causada por enfermedades de origen infeccioso (Ameghino, 1990).

Según datos obtenidos de comunidades campesinas, la enterotoxemia sería una de las causas principales de mortalidad neonatal; así mismo, los problemas neumónicos y reproductivos, principalmente abortos, son importantes también (Ameghino, 1990; Ramírez, 1991).

El conocimiento de las enfermedades virales en los CSA es escaso comparado con otras especies. No muchas enfermedades virales han sido reportadas en los camélidos sudamericanos desconociéndose muchas veces la prevalencia, epidemiología, patogenia, etc (Bustinza, 2000). Si bien se conoce que los CSA son susceptibles a un número importante de enfermedades virales descritas en el ganado de origen europeo, la dinámica de las enfermedades infecciosas es aún desconocida (Victorio, *et al.*, 2004). Estudios realizados en comunidades campesinas (Manchego, *et al.*, 1998) refuerzan la hipótesis de la habilidad de ciertos virus de utilizar más de una especie en su cadena

epidemiológica lo que es propiciado por la crianza mixta de las diferentes especies de rumiantes tanto autóctonos como de origen europeo, característicos de este tipo de crianza.

Serologicamente, se ha demostrado la exposición de camélidos sudamericanos a Virus Respiratorio Sincitial Bovino, Parainfluenza tipo 3, Herpesvirus Bovino tipo 1 y Virus de la Diarrea Viral Bovina (Álvarez, et al., 2002; Manchego, et al., 1998; Risco, *et al.*, 1998; Rivera, et al., 1987a; Sánchez, et al., 2003; Victorio, et al., 2004). Sin embargo, no se ha demostrado claramente la correlación de la presencia de estos virus en procesos neumónicos y abortivos en alpacas y llamas.

Actualmente, existe la tendencia de reemplazar los modelos de experimentación *in vivo* por modelos *in vitro* por razones económicas y éticas. La técnica de cultivo celular representa un excelente método para estudiar la conducta de las células animales libres de las variaciones de un sistema que podría ocurrir en el animal tanto en condiciones normales de homeostasis como bajo el stress de un experimento (Wisel, 2000). Lamentablemente, no existe ninguna línea celular obtenida de CSA, lo que imposibilita la realización de ensayos en células que permitan obtener el conocimiento de los mecanismos de control y las funciones específicas de la especie.

El objetivo del presente estudio fue demostrar la permisibilidad de los cultivos secundarios de Llama y Alpaca a la infección con Herpesvirus Bovino, Virus de la Diarrea Viral Bovina, Virus Parainfluenza 3 Bovina y Virus Respiratorio Sincitial Bovino.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

A.- LA TÉCNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS.

1.-Generalidades.

La técnica de cultivo celular existe desde principios de siglo, actualmente se encuentra en una fase de especialización en la que la principal preocupación es el conocimiento de los mecanismos de control y las funciones diferenciadas según el tipo de célula y la especie a la que estas pertenecen. (Freshney, 1987). Representa un excelente método para estudiar la conducta de las células animales libres de las variaciones de un sistema que podría ocurrir en el animal tanto en condiciones normales de homeostasis como bajo el stress de un experimento (Wisel, 2000).

Reina (2003), menciona las siguientes ventajas del uso de cultivos celulares:

a. Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.

En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular)

b. Caracterización y homogeneidad de la muestra.

Las células en cultivo de una línea celular, o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas, con lo que se supera el grave problema de heterogeneidad de las muestras inherente asociado al uso de animales de experimentación.

c. Economía.

Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la

droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en animal completo.

d. Motivaciones éticas.

La investigación biomédica supone el sacrificio cada año de muchos miles de animales de experimentación. El cultivo celular no puede reemplazar siempre al ensayo *in vivo* pero es una alternativa válida en muchas situaciones

2.-Tipos de cultivos de tejidos.

Según Freshney (1987), se puede hablar de tres tipos de cultivos:

a. Cultivo de órganos.

Implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir en cada nuevo experimento de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

b. Explantes primarios.

Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

c. Cultivo celular.

Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. La población celular se hace uniforme y homogénea al

predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. A este tipo de cultivo se le puede denominar línea celular, pudiendo ser finitas o infinitas. A las líneas finitas obtenidas de un subpasaje de células de un explante primario se les denomina cultivos secundarios.

3.-Aplicaciones del cultivo celular.

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular (Reina, 2003; Wisel, 2000).

a. Actividad intracelular.

Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como: transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético, entre otras.

b. Flujo intracelular.

Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como: ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas.

c. Ecología celular.

Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular o de su diferenciación por ejemplo: estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.

d. Interacciones celulares.

Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

B.- AGENTES VIRALES CAUSANTES DE CUADROS RESPIRATORIOS Y REPRODUCTIVOS.

1.- Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB).

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un virus RNA de cadena simple y sentido positivo, perteneciente a la Familia Flaviviridae y al género Pestivirus. Otros dos miembros de este género son el virus de la Enfermedad de la Frontera de las ovejas y el virus de la Fiebre Porcina Clásica (Franki, *et al.*, 1991; Carter, 2005).

El virión consiste de 4 proteínas: la proteína del capsido C y 3 glicoproteínas E^{rns}, E1 y E2; el genoma codifica además 6 o 7 proteínas no estructurales, N^{pro}, NS2-3, o NS2 y NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b (Lazar, 2003; Silflow, *et al.*, 2005). La proteína de envoltura E2 es el blanco de anticuerpos neutralizantes y esta implicada en la adhesión a células, mientras que la NS3 es una proteína altamente antigénica e inmunogénica (Silflow, *et al.*, 2005).

Basados en comparación de las secuencias genómicas, el VDVB ha sido dividido en 2 genotipos, VDVB 1 y VDVB 2. La diferencia biológica más importante entre estos dos genotipos es que ambos son antigenicamente diferentes (Ridpath, 2003). Las cepas de baja virulencia pueden ser encontradas en cualquiera de los dos genotipos. Las cepas hipervirulentas pertenecen al genotipo 2 (Ridpath, 2005)

A su vez, estos genotipos han sido divididos en subgenotipos; así, el VDVB 1 conformado inicialmente por los subtipos 1a y 1b, está constituido ahora por 11 subgenotipos 1a - 1j (Flores, *et al.*, 2003; Vilcek, *et al.*, 2005; Stalder, *et al.*, 2005). La tipificación del genotipo 2 no ha sido tan extensa debido probablemente a la menor colección de aislados virales para este tipo de análisis, a la fecha sólo 2 a 4 grupos genéticos han sido reconocidos para este genotipo (Vilcek, *et al.*, 2005; Flores, *et al.*, 2003).

El virus posee dos biotipos: citopatogénico (CP) y no citopatogénico (NCP) en base a su característica en cultivos celulares, pero ambos pueden causar manifestaciones clínicas similares (Ridpath, 2003). Característica común a todos

los biotipos CP es la producción de la proteína no estructural NS3, mientras que en los biotipos NCP sólo puede ser detectada la forma no escindida NS2-3 (Peterhans *et al.*, 2003; Tautz, *et al.*, 1998) *In vitro*, las cepas citopáticas de VDVB inducen clásicamente vacuolización y muerte celular (Grummer, 2001)

Una vez que el genoma penetra el citoplasma, es traducido por ribosomas del huésped en una gran poliproteína, dicha poliproteína es luego escindida por proteasas tanto virales como del huésped en las ya mencionadas 10 proteínas individuales (Carter, 2005). El VDVB es liberado por gemación dentro de la cisterna del retículo endoplasmático, luego ocurre una maduración en el aparato de Golgi y la salida del virus por exocitosis o lisis celular, como mecanismo alternativo a la gemación por la membrana celular presentado por otros virus (Grummer, 2001)

La infección con el VDVB ha sido descrita en diferentes especies tales como porcinos, ovinos, caprinos y rumiantes silvestres. Los signos clínicos en estas especies son similares a los reportados en bovinos pero el cuadro clínico es menos común en estas especies (Loken, 1995; Deregt, *et al.*, 2004)

El virus puede estar presente en las distintas secreciones y semen de los animales infectados. La diseminación es por contacto directo, de un animal infectado a uno susceptible; o indirecto por medio de personas o instrumentos. El modo de infección es por ingestión o inhalación (Carter, 2005; Houe, 1995), incluso se plantea la posibilidad de que el virus pueda ser transmitido por vía aerógena bajo ciertas circunstancias (Mars, *et al.*, 1999). Las primeras células que soportan la replicación viral son las tonsilas y otros tejidos linfoides regionales, posteriormente el virus se disemina por vía sanguínea y linfática ocasionando diversos síndromes (Baker, 1995).

In vivo, el virus puede ser aislado de células sanguíneas, bazo, riñones, nódulos linfáticos, cornetes nasales, intestino, pulmón e hígado (Carter, 2005). *In vitro*, el virus puede ser replicado de distintas líneas celulares de origen bovino tales como la línea celular MDBK, proveniente de células de riñón ; en líneas celulares de riñón de ternero JCK, células pulmonares de embrión bovino BEL, cultivos primarios de cornete nasal BT(Deregt ,*et al.*, 2004; Makoschey, *et al.*,

2004). En cambio, la propagación en células de conejo RK-13 es ineficiente y resiste algunos pocos pasajes. Los intentos de propagar el virus en células de riñón porcino PK-15 han sido infructuosos (Deregt, *et al.*, 2004).

Las infecciones por VDVB varían desde cuadros clínicamente inaparentes hasta la presentación de enfermedad severa que generalmente involucra uno o más sistemas. Los sistemas más frecuentemente afectados son el respiratorio, gastrointestinal, inmune y reproductivo (Loken, 1995; Ridpath, 2003; Fulton, *et al.*, 2005). Históricamente, el VDVB estuvo asociado a enfermedad del tracto digestivo, incluyendo cuadros de alta mortalidad. Actualmente, el VDVB es asociado más frecuentemente con enfermedad respiratoria e infecciones fetales (Fulton, *et al.*, 2005) El virus ha sido asociado con el complejo respiratorio bovino demostrando su participación en la infección del tracto respiratorio causada por PI3, HVB-1, VRSB o *Pasteurella haemolytica*, actuando de manera sinérgica con dichos agentes (Peterhans, *et al.*, 2003) Recientemente, cepas del genotipo 2 han sido asociadas con brotes de una enfermedad altamente fatal caracterizada por trombocitopenia y hemorragias (Ridpath, *et al.*, 2003). Si la infección ocurre durante la gestación, las consecuencias dependen de la etapa gestacional y puede resultar en muerte embrionaria, abortos, nacidos muertos, malformaciones o el nacimiento de terneros Persistentemente Infectados (PI)(Makoschey, 2004). A pesar de la gran diversidad de cuadros clínicos causados por el VDVB, se sabe que la mayoría de infecciones son subclínicas (Carter, 2005).

El aspecto de mayor relevancia de las infecciones subclínicas con el VDVB es la infección de una vaca durante el primer tercio de gestación (antes de 120 días) con una cepa no citopatógena (NCP). El resultado de esta infección puede ser el nacimiento de la cría inmunotolerante al virus e infectada persistentemente (Mc Gowan y Kirkand, 1995). Los animales con infección persistente (PI) son incapaces de formar anticuerpos contra la cepa infectante y son los principales reservorios del virus (Baker, 1987). Muchos de estos animales usualmente mueren durante los primeros meses de vida debido a infecciones secundarias del tracto respiratorio o entérico (Bolin, 1990), pero también pueden tener aspecto normal y llegar a la etapa reproductiva transmitiendo el virus a su progenie.

Los programas de control a nivel mundial siguen un modelo de Prueba y Eliminación de animales PI. La vacunación como medida única de control, sin eliminación de animales PI, no ha demostrado mejorar la situación epidemiológica. Los animales PI que permanecen en una población convaleciente o inmunizada, aparentemente representan tal riesgo de infección que las fallas reproductivas incluyendo el nacimiento de más animales PI continúan ocurriendo (Moenning, *et al.*, 2005).

En el Perú se han detectado anticuerpos contra el VDVB en ganado vacuno (Rivera, *et al.*, 1993; Zanabria, *et al.*, 2000) y ovino (Rosadio, *et al.*, 1984); y en alpacas y llamas de una empresa organizada de la sierra sur, donde se encontró 11% en alpacas (Rivera *et al.*, 1987a) y 8.5% en llamas (Rivera, *et al.*, 1990), estudios posteriores en CSA en una comunidad campesina de Arequipa, han demostrado un 14% de alpacas positivas y un 10% en llamas (Manchego, *et al.*, 1998). No se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el VDVB, durante una campaña reproductiva en alpacas de la estación experimental IVITA Cusco (Risco, *et al.*, 1998), pero se encontró una prevalencia de 12% en animales pertenecientes a una comunidad campesina de la misma región (Álvarez, *et al.*, 2002).

2.- Virus Herpes Bovino 1 (VHB-1) o Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB).

El Virus Herpes Bovino 1, causante de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina es un virus que pertenece a la familia Herpesviridae, sub familia Alphaherpesvirinae, género Varicellovirus. Posee cápside icosaédrica y envoltura. Su material genético está formado por ADN de cadena doble (Carter, *et al.*, 2005). Alrededor del 10% del ADN viral transporta una cola de ADN celular, lo que indicaría que el ADN del VHB-1 puede recombinarse frecuentemente con el ADN de la célula (Pidone, *et al.*, 1999).

Todos los herpesvirus codifican un gran número de proteínas implicadas en el metabolismo de ácido nucleico, síntesis de ADN y procesamiento de proteínas,

que son expresadas sobre la envoltura viral y sobre la membrana de las células infectadas (Franco, *et al.*, 2002). Por lo menos 33 de las proteínas codificadas por el VHB-1 son estructurales; de estas, por lo menos 13 están asociadas a la envoltura ;y entre las proteínas estructurales al menos 11 son glicoproteínas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, y gN presentes en la envoltura viral formando proyecciones y juegan un rol importante en las interacciones virus-célula, como adherencia, penetración, difusión célula-célula y salida. Estas interacciones iniciales son primariamente mediadas por las glicoproteínas virales: gB, gC y gD que son las principales proteínas de la envoltura (OGTR, 2005; Okazaki, *et al.*, 2005)

La proteína gB participa en la adsorción viral y fusión celular; es responsable de interferir con proteínas celulares causantes de efectos citopáticos y de la inducción de anticuerpos neutralizantes (Li, 1996; Pidone, *et al.*, 1999). La gC es considerada como la principal proteína implicada en la unión e ingreso del virus a través de receptores similares a la heparina sobre la superficie de las células blanco (Babiuk, *et al.*, 1996, Pidone, *et al.*, 1999). La gD es la glicoproteína involucrada en la neutralización, es la responsable de la penetración del virus en la célula blanco y también se le atribuye participación en la adsorción viral y la fusión celular (Li, 1996; Babiuk, *et al.*, 1996; Pidone, *et al.*, 1999). Además, esta glicoproteína sería la responsable de inducir apoptosis en las células infectadas (Hanon, *et al.* ,1999). La glicoproteína H es un componente estructural del virion que forma un complejo con la glicoproteína gL. Los estudios demuestran que la gH es esencial en el ciclo infeccioso del virus y esta involucrado específicamente en la penetración viral y en la diseminación célula-célula. El complejo gH/gL es necesario para la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes y el anclaje de la gL a la membrana plasmática (Meyer, *et al.*, 1998).

Se han definido dos subtipos de VHB-1, en base al análisis de unión/restricción de enzimas por anticuerpos monoclonales, estos han sido designados como VHB-1.1 (sub tipo respiratorio) y VHB-1.2 (sub tipo genital). A su vez el subtipo VHB-1.2 ha sido dividido en VHB 1.2a y VHB 1.2b. El primero puede

causar abortos, mientras que el último aparentemente no. Ambos han sido asociados con vulvovaginitis y balanopostitis (Carter, *et al*, 2005).

La replicación del VHB-1 comparte características comunes a algunos otros miembros de la familia herpesviridae, la replicación ocurre en células epiteliales del tracto respiratorio y reproductivo. La adherencia esta mediada por las glicoproteínas de la envoltura gB y gC , estas interactúan con receptores celulares de tipo heparina sulfato, aunque se propone que sean mas las proteínas celulares implicadas en la entrada viral; la interacción de estas glicoproteinas y los receptores celulares activan la fusión de la envoltura viral con la membrana celular para la penetración de la nucleocapside en el citoplasma, la cual llega a la membrana celular por medio de microtúbulos, liberando su molécula lineal de ADN viral dentro del núcleo a través de los poros de la membrana nuclear, donde se realiza la transcripción de ARN mensajeros para la síntesis proteica, replicación del ADN viral para la nueva progenie del virus, y el ensamblaje final de nuevas partículas virales (Li *et al.*,1996; OGTR, 2005). El virus adquiere su envoltura mientras gema a través de la membrana nuclear, es luego transportado en vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática y liberado de la célula (Babiuk, *et al.*, 1996). La replicación viral completa se asocia con la lisis de la célula infectada (Mandell, 2005).

La infección ocurre por las vías respiratorias y genitales. El contagio se da por contacto directo, a través de las secreciones nasales, oculares, genitales, además de los líquidos y tejidos fetales; o indirecto, por personas o equipos (Radostits, *et al.*, 2002; Richey, 1994).

El VHB-1 se ha aislado de vacunos, búfalos de agua, cabras y ovejas, especies en las que causa cuadros clínicos. Se ha demostrado además la infección de un elefante asiático, *Elaphus maximus*, antílopes, minks y ferrets, pero sin cuadro aparente. Experimentalmente solo se ha demostrado la infección de conejos, siendo imposible infectar cobayos, ratones y ratas, así como embriones de pollo. (OGTR, 2005)

El Virus Herpes Bovino 1 es capaz de atacar distintos tejidos, pudiendo así causar una variedad de formas clínicas dependiendo del tejido animal que infecte.

Los cuadros clínicos causados por el VHB-1 pueden ser agrupados en: infecciones del tracto respiratorio, infecciones oculares, abortos, infecciones genitales e infecciones generalizadas en neonatos (Richey, 1994). El VHB-1 infecta células epiteliales del tracto respiratorio alto, mucosa vaginal y prepucial, tonsilas, conjuntivas, además de linfocitos T CD-4, monocitos y macrófagos (Lovato, 2003).

En cultivos celulares, el VHB-1 produce la formación de células multinucleadas con degeneración por tumefacción, edema pronunciado y la presencia de inclusiones intranucleares tipo Cowdry (Mandell, 2005).

Generalmente el periodo de incubación es de 4 a 6 días y la infección persiste por 10 a 14 días (Richey, 1994).

La forma respiratoria de IBR es usualmente una infección del hato, con todos los animales del grupo afectados. Se ven afectadas las vías respiratorias altas: cornetes y senos nasales, faringe, laringe y traquea. La mortalidad es inusual a menos que el cuadro se complique con una infección secundaria. El VHB-1 puede iniciar el complejo respiratorio bovino causando inmunosupresión, permitiendo infecciones secundarias que causan neumonía severa y muerte (Lovato, 2003; Searl, 1998). Los casos de abortos pueden ocurrir en cualquier momento de la gestación, presentándose generalmente en la segunda mitad, la muerte y absorción fetal pueden ocurrir en gestaciones tempranas y pueden ser confundidos con problemas de infertilidad. La forma ocular puede ocurrir como parte de la forma respiratoria o independientemente y se manifiesta como una severa conjuntivitis (Searl, 1998).

Como otros miembros de la familia Herpesviridae, el VHB-1 puede persistir en forma latente en las neuronas ganglionares del trigémino o sacro, e incluso en las tonsilas. Esta propiedad le permite sobrevivir en estado inactivo en ciertos lugares del cuerpo del animal infectado. Bajo condiciones de stress, como parto o transporte, el virus puede ser reactivado y causar infecciones usualmente de tipo subclínica; siendo una fuente de infección para animales susceptibles. La superinfección con otros virus como el PI3, puede también causar la reactivación

(Wentik et al., 1993). La reactivación puede ocurrir tras la administración exógena de corticosteroides (Winkler, 2000).

Actualmente, los programas de erradicación incluyendo vacunación, aislamiento, control de fronteras y eliminación de animales están implantados en diversos países europeos. La vacunación puede ser usada para reducir la severidad de la enfermedad, pero no puede prevenir la infección debido al carácter endémico del VHB-1 (OGTR, 2005).

La distribución del virus es mundial, la seroprevalencia en bovinos llega al 100% y la mortalidad puede llegar al 10%.

En el Perú, desde su primer reporte, en el año 1965, se ha determinado por evaluaciones serológicas que la infección esta distribuida en forma subclínica en varias zonas del país, aunque no se ha hecho reporte de presencia clínica (Sánchez, *et al.*, 2003). Está considerado como uno de los principales agentes componentes del complejo respiratorio bovino presente en centros de engorde y en establos lecheros del país (Rivera, *et al.*, 1994; Zanabria, *et al.*, 2000). En bovinos lecheros del valle de Lima presenta un 36% de seroprevalencia (Sánchez, *et al.*, 2003). En contraste con el ganado lechero, el VHB-1 presenta hasta un 75% de incidencia en toros de centro de engorde del valle de Lima (Zanabria, *et al.*, 2000). El 68% de los bovinos criollos de la provincia de Parinacochas, Ayacucho, presentaron anticuerpos neutralizantes contra el VHB-1 (Zacarías, *et al.*, 2002); lo que contrasta con menos del 1% de bovinos de crianza extensiva en el departamento de Cajamarca presentaron anticuerpos (Villacaqui, *et al.*, 2005).

La presencia del virus ha sido demostrada también en Ovinos de Arequipa, donde la seroprevalencia alcanzo un 33% (Manchego, *et al.*, 1998).

En camélidos sudamericanos, Rivera (1987a) demostró una seroprevalencia de 5% en alpacas de una empresa asociativa del departamento de Puno, mientras que Rosadio (1993) encontró un 16% de animales positivos en comunidades rurales de la sierra. Además, se ha reportado una seroprevalencia de 18% en Alpacas y 17% en Llamas de un rebaño mixto de una comunidad alpaquera de Arequipa (Manchego, *et al.*, 1998). Así mismo en el año 2004 se

reporto una seroprevalencia de 80% en alpacas de la provincia de Canchis, departamento de Cusco (Victorio, *et al.*, 2004).

3.- Virus Respiratorio Sincitial Bovino (VRSB).

El Virus Respiratorio Sincitial Bovino pertenece a la Familia Paramixoviridae, genero Pneumovirus, es un virus envuelto, con nucleocapside helicoidal. Su genoma consiste de ARN no segmentado de cadena simple y sentido negativo (Carter, *et al.*, 2005).

El genoma codifica dos proteínas no estructurales la NS1 Y NS2. Las proteínas no estructurales se encuentran relacionadas al nucleocapside y a la envoltura. El nucleocápside consiste además de RNA, de la nucleoproteína (N), Fosfoproteína (P) y RNA polimerasa (L). Dos proteínas mayores de membrana: la proteína de fusión (F) y la glicoproteína de unión (G); la pequeña proteína hidrofóbica (SH) y la M2, proteína asociada con la envoltura viral (Valentova, 2003).

Las proteínas NS1 y NS2 están involucradas en mecanismos de bloqueo en la expresión de genes celulares para la producción de IFN alfa/beta, lo que incrementa la virulencia del virus (Valarcher, *et al.*, 2003; Schlender *et al.*, 2003). La fosfoproteína P es una proteína polifuncional que juega un rol principal en la transcripción y replicación del ARN genómico (Khattar, *et al.*, 2001). Las proteínas G y F estimulan la producción de la respuesta humoral y celular. La glicoproteína G es la proteína de unión, que hace posible la adherencia a la célula, esta unión no es especie específica y existe homología con la proteína G del Virus Respiratorio Sincitial Humano, ambas se unen a glucosaminoglicanos de la superficie celular (Schlender, *et al.*, 2003); la glicoproteína F es responsable de la penetración a la célula huésped y la difusión del virus en el organismo, esta también le da la característica de sincitial (Valarcher, *et al.* 2003; Valentova, 2003). Karger (2001) demostró que virus mutantes carentes de los genes G o SH o ambos, fueron capaces de completar varios ciclos de crecimiento en cultivos

celulares, lo que resalta la importancia de la proteína F en la replicación viral. Sin embargo la coexpresión de los genes F, G y SH es necesaria para inducir la fusión celular, mecanismo importante en la diseminación del virus (Samal, et al., 1997).

El VRSB infecta naturalmente, ganado vacuno, caprino y ovino. El ganado infectado es el principal reservorio de la enfermedad y la transmisión se realiza por contacto directo con secreciones o a través de aerosoles de un animal a otro (Larsen, 2000; Carter, *et al.*, 2005)

La presencia del VRSB en cultivos de células infectadas se detecta por su aspecto sincitial característico, el grado de formación de este depende del tipo de cultivo celular, el medio y la cepa viral (Rosado, 2006)

La velocidad de diseminación de la enfermedad depende del tipo de manejo productivo, siendo más rápida en aquellos sistemas intensivos, bastando de 3 a 10 días para infectar toda la población. En sistemas extensivos, demora de semanas a meses en afectar todo el rebaño. Una vez expuesto, se requieren de 2 a 4 días para que un animal susceptible comience a mostrar signos clínicos. En un brote de enfermedad respiratoria aguda, es de esperar una tasa de infección del 100 %, morbilidad del 20 al 50 % y mortalidad menor al 5% (Richey, 2002).

El cuadro clínico presenta dos fases, una fase inicial, de enfermedad leve que es seguida por una fase aguda con presentación de falla respiratoria severa. Se postula que la segunda fase es debida a una reacción de hipersensibilidad por la continua exposición o re exposición al virus (Radostits, 2002).

El BRSV inicia su replicación en las células epiteliales del tracto respiratorio superior, produciendo alteraciones morfológicas y funcionales en el aparato mucociliar, luego invade el tracto respiratorio inferior afectando a las células del epitelio bronquial, bronquiolar y alveolar, produciendo necrosis y descamación. La formación de sincitios se observa generalmente en las paredes bronquiolares y en los alvéolos y tales sincitios presentan siempre VRSB en replicación (Viuff, *et al.*, 1996). El VRSB infecta también al macrófago alveolar (Li, *et al.*, 1999), alterando de esta manera los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del pulmón. De esta manera constituye un agente primario que condiciona la aparición de agentes oportunistas secundarios desencadenantes de los cuadros

fatales de la enfermedad (Masot, *et al.*, 2000; Richey, 2002). Experimentalmente se ha demostrado que el VRSB puede inducir apoptosis en células MDBK, lo que contribuiría a delinear los mecanismos que regulan la lesión tisular y la potencial reparación pulmonar tras la infección con VRSB (Cristina, *et al.*; 2001)

Valentova *et al.* (2003) demostraron la presencia de ARN en leucocitos periféricos y mucosa nasal de vacas infectadas en estado convaleciente. Este descubrimiento podría sugerir la persistencia del virus en células del sistema inmune.

Los terneros recién nacidos obtienen anticuerpos vía calostro. Sin embargo la inmunidad calostrual no protege ante la enfermedad clínica. Por otra parte, la inmunidad activa es protectora ante la enfermedad clínica pero no ante la reinfección (Larsen, 2000).

En el país, los estudios de seroprevalencia, reportan 56% de animales positivos en ganado lechero y 42 % en ganado de engorde de Lima (Rivera, *et al.*, 1987b). En ovinos, se determinó una seroprevalencia de 47.1% en la sierra (Rosadio, *et al.*, 1984). En alpacas de una empresa asociativa del departamento de Puno se determinó el 16.6% de animales seroreactores (Rivera, *et al.*, 1987a); Manchego, *et al.* (1998), en una comunidad de Arequipa, reportó el 9 % de alpacas positivas, mientras que Victorio, *et al.* (2004) encontró una seroprevalencia de 80.2 % en alpacas de la provincia de Canchis en el Cusco. En llamas de dos empresas ganaderas del departamento de Puno se obtuvieron 20 y 26 % de positivos, mientras que en tres comunidades del mismo departamento se obtuvieron seroprevalencias de 5.2%, 25% y 22 % respectivamente (Rivera, *et al.*, 1990). Mientras que Manchego (1998) no obtuvo animales positivos a serología en Arequipa. Las pruebas serológicas realizadas en vicuñas en semicautiverio, demostraron que esta especie no ha sido expuesta al agente (Rivera y Ameghino, 1990).

4.- Virus Parainfluenza Bovino Tipo 3 (VPI3).

El Virus Parainfluenza Bovino Tipo 3 (VPI3) pertenece al género Paramyxovirus de la familia Paramyxoviridae. Se distinguen de otros virus dentro de su propia familia por la presencia de una glicoproteína de envoltura con actividad de neuraminidasa y hemaglutinina (Mandell, 2005). El virión esta compuesto por una sola cadena de ARN de polaridad negativa rodeada por una envoltura lipídica de origen en la célula huésped. Son virus pleomorfos con un diámetro promedio de 200 nm (Schmidt, *et al*; 2001).

El ARN del VPI3 codifica 6 proteínas estructurales, la polimerasa viral (L), la proteína de la nucleocápside (NP), la fosfoproteína (P), la proteína Matriz (M), Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F); además de tres pequeñas proteínas no estructurales (C, D, V) (Haller, 2000).

Las proteínas NP, L y P asociadas con el ARN viral forman el core de la nucleocápside del Virus Parainfluenza. La proteína NP se une al ARN viral formando un molde que permite que las proteínas L y P transcriban el ARN mensajero y repliquen el genoma. La proteína M participa en la inserción y agregación de las glucoproteínas virales HN y F sobre la superficie de la célula huésped y con la atracción de nucleocápsides completas a estas áreas que pronto darán brotes para convertirse en viriones. La proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa funciona en la fijación virus-célula huésped a través de receptores de Ácido siálico y tiene actividad de neuraminidasa. La proteína F participa en la fusión virus-membrana de la célula huésped, necesaria para la entrada de la nucleocapside y la infección de la célula huésped. En forma similar, esta proteína forma parte en la fusión de la membrana entre células huésped (formación de sincitios) y la hemólisis de eritrocitos. Se ha demostrado que las proteínas HN y F inducen anticuerpos neutralizantes y células T citotóxicas. También se ha mostrado que la proteína de la nucleocapside (NP) y de la Matriz (M) inducen células T citotóxicas (Mandell, 2005).

Según determinación de anticuerpos este paramixovirus esta distribuido sobretodo en bovinos, otros rumiantes domésticos y salvajes y se presenta

también con una variante antigénica en el hombre (Dirksen, 2005). La infección con VPI3 es común en ovejas y probablemente en cabras (Smith, 1990).

Es patógeno sobretodo para terneros no protegidos por la inmunidad calostrual y circunstancialmente también para bovinos jóvenes o adultos. En estos casos el VPI3 se convierte en el principal agente de la forma más leve, catarral-viral de la bronconeumonía enzootica (Dirksen, 2005; Ogilvie, 1990).

Además, el VPI3 causa lesiones en los cilios y afecta a los macrófagos alveolares por lo que se convierte en un decisivo preparador del terreno para superinfecciones mas graves (BRSV, micoplasmas, pasteurelas, agentes piógenos y necróticos) causantes de las formas fibrinosas enfisematosas o purulentas de la BNE; posiblemente en sinergismo con otros virus también juega un papel secundario en abortos (Dirksen, 2005).

El rol mas importante del VPI3 es predisponer el tracto respiratorio a infecciones subsecuentes por otros virus y bacterias como *P. haemolytica*. La severidad de los signos aumenta con el desarrollo de neumonías bacterianas secundarias y, si ocurriera la muerte, es generalmente el resultado de infecciones bacterianas secundarias (Smith, 1990). Los casos mortales generalmente son complicados por una neumonía bacteriana secundaria; especialmente por *P. haemolytica* o por *P. multocida* (Rebhun, 1995).

En células cultivadas *in vitro*, los primeros cambios morfológicos observables incluyen redondeamiento focal y aumento del tamaño de citoplasma y núcleo. Otros cambios que pueden ser observados incluyen vacuolas citoplasmáticas únicas o multiloculares, inclusiones basófilas o eosinófilas y la formación de células gigantes multinucleadas. Estas células gigantes generalmente aparecen en etapas tardías de la infección y contienen entre 2 a 7 núcleos (Henrickson, 2003).

Histológicamente se observan bronquiolitis y peribronquiolitis, además de cambios proliferativos y degenerativos en las células epiteliales de los bronquiolos y alvéolos. Corpúsculos de inclusión tanto intracitoplasmáticos como intranucleares pueden ser hallazgos histológicos (Smith, 1990).

El virus invade el tracto respiratorio y puede afectar a los macrófagos pulmonares, lo cual permite la replicación viral así como la disfunción fagocítica (Ogilvie, 1990).

Los anticuerpos sericos (IgG) o del moco traqueal (IgA), alcanzan su título máximo unas 4 semanas post infección. Las defensas del organismo animal frente a este virus se basan sobre todo en inmunidad tisular y secretora de las mucosas respiratorias (Dirksen, 2005).

Los anticuerpos IgA nasales contra Virus Parainfluenza tipo 3 probablemente desempeñan un papel importante en la resistencia a la infección. Los anticuerpos en las secreciones nasales pueden estar correlacionados más estrechamente con la resistencia del huésped a la infección que el nivel de anticuerpos en suero (Mandell, 2005).

La amplia prevalencia de anticuerpos para este virus indica que es ubicuo en el ganado mundial. Este hallazgo sugiere la posibilidad de infecciones repetidas o por lo menos persistencia de anticuerpos después de la infección (Smith, 1990).

En el Perú, el 45% de ganado de engorde y 21% de ganado de leche del valle de Lima, demostró anticuerpos para el VPI3 (Rivera, et al., 1987b).

En Camélidos sudamericanos, la seroprevalencia encontrada en estudios realizados en el país, encontraron un 35% de alpacas seropositivas en una SAIS de Puno (Rivera, *et al.*, 1987a); en una comunidad de Arequipa, el 66% de alpacas fueron positivas (Manchego, *et al.*, 1998) En el año 2004, Victorio encontró una prevalencia de 67.6% de alpacas seropositivas a VPI3 en el departamento de Cusco. La prevalencia encontrada en llamas fue de 28 a 54% en animales de empresas asociativas y de 27 a 75% en tres comunidades campesinas (Rivera, *et al.*, 1990). Mientras que en vicuñas en semicautiverio de Puno no se encontraron reactivos (Rivera y Ameghino, 1990).

III. MATERIALES Y METODOS

A.- ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES SECUNDARIOS DE ALPACA Y LLAMA.

1.-Obtención de fetos de Alpacas y Llamas.-

Se obtuvieron 3 fetos de alpacas y un feto de llama, de madres de descarte aparentemente normales, sin signología clínica. Los cuernos uterinos completos se obtuvieron durante el faenamiento en un camal de la ciudad de Huancavelica. Los fetos fueron remitidos al Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Unidad de Virología, conservados en refrigeración a 4°C, para su inmediato procesamiento.

2.-Establecimiento de cultivo Primario.-

De los fetos se obtuvieron, de manera estéril, los siguientes órganos: cornete nasal, piel, bazo, pulmón, riñón y testículo, obteniéndose trozos de 1 cm. cúbico los cuales se conservaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con antibiótico por 2 horas, a temperatura ambiente hasta su uso en la obtención de células(Fig. 1).

Se utilizó el Método de Explante Primario, descrito por Freshney (1987). Los órganos fueron trabajados en Flujo Laminar para asegurar la esterilidad del procedimiento.

Descripción del Método de Explante Primario.

- Los trozos de tejido obtenidos de los fetos son extraídos del medio de cultivo con antibiótico y lavados con suero fisiológico estéril.
- Se transfiere a una placa Petri donde se separa el tejido no deseado como grasa y tejido necrotico. El tejido es diseccionado en trozos muy finos, de aproximadamente 1mm de diámetro.

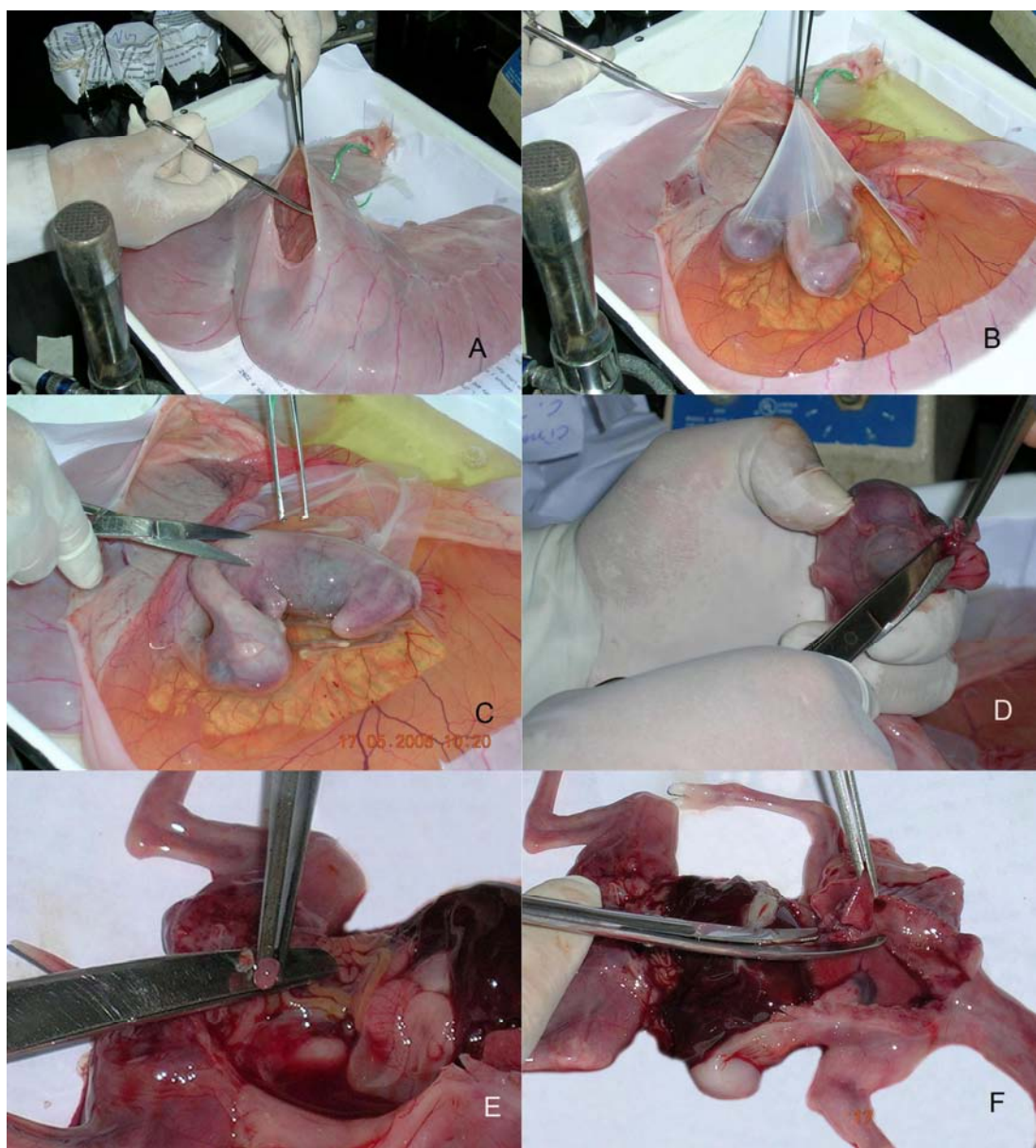


Figura 1. Obtención de órganos de feto de alpaca para la realización de los explantes primarios. Disección de útero grávido (A). Disección de la membrana amniótica y exposición del feto (B). Obtención de muestra de piel (C), cornete nasal (D), testículo (E) y pulmón (F).

- Se realiza un nuevo lavado con suero fisiológico, descartando así células sanguíneas, restos de tejidos y fluidos que puedan desprenderse.
- Los pequeños trozos de tejido obtenidos son trasladados a frascos de cultivo celular de 25 cm², una pequeña cantidad de medio de crecimiento (10 % de suero fetal) es agregada, aproximadamente 2 ml.
- La suspensión es distribuida uniformemente por toda la superficie de crecimiento del frasco y es mantenida en incubadora a 37⁰C por 24 a 36 horas.
- Posteriormente a la adhesión de los trozos de tejido, el volumen de medio puede ser aumentado gradualmente durante los 2 a 3 días siguientes, hasta alcanzar un volumen de 5 ml para frascos de 25 cm². El medio debe ser cambiado semanalmente.
- Una vez que el crecimiento celular alcance el 80 % de la superficie del frasco, las células estarán listas para el primer pasaje.

3.-Establecimiento de cultivos secundarios.-

Se establecieron los cultivos secundarios a partir de las células obtenidas de los explantes primarios. Se utilizó el método de desagregación celular descrito por Freshney (1987)

Las células fueron cultivadas con los medios Eagle Minimal Esencial (MEM) y Leibowitz L-15 en una proporción de 50:50 suplementado con 10 % de suero fetal bovino libre de anticuerpos contra los virus de BVD adquirido comercialmente.

La incubación se realizó a 37 °C, con un nivel de CO₂ de 5 % y una humedad relativa de 65%.

Descripción del método de desagregación celular y sub-pasaje.

- Eliminar el medio de las botellas.
- Lavar con suero fisiológico estéril, 5ml/25 cm², para eliminar los restos de medio que podrían inhibir la acción de la tripsina.

- Agregar la tripsina (0.25%), 3ml/25 cm², procurando que cubra totalmente la superficie de crecimiento de la botella. Permitir que la tripsina actúe por aproximadamente 15 – 30 segundos y luego dejar una cantidad de 0.5 – 0.8 ml suficiente para que cubra toda la superficie de crecimiento de la botella.
- Incubar las botellas a 37°C por aproximadamente 5 minutos, hasta que se pueda observar desprendimiento de la monocapa y disgregación celular.
- Después de ocurrida la disgregación celular, el medio de crecimiento (10 % de suero fetal) es agregado gradualmente a la botella de cultivo, lavando con este la superficie de crecimiento de la botella ayudando así a desprender suavemente las células de la monocapa. Anteriormente se realiza la dilución para tener una concentración de 400,000 células por ml de medio, según conteo por cámara de Neubauer.
- Las células desagregadas son resuspendidas utilizando 5 ml de medio para botellas de 25 cm² y 15 ml para botellas de 75 cm² completando así el pasaje.

B.- ENSAYOS DE PERMISIBILIDAD DE CULTIVOS CELULARES.

Se utilizaron cultivos celulares secundarios de células de alpaca y llama. Las células utilizadas fueron del tercer o cuarto subpasaje.

Las cepas virales usadas fueron la cepa Cooper de Herpesvirus Bovino 1, cepa Singer del Virus de la Diarrea Viral Bovina, cepa SF-4 del virus Parainfluenza Bovino 3 y cepa Mohanty del virus Respiratorio Sincitial Bovino.

Para los ensayos, las células fueron sembradas en placas Petri de 3.5 cm. de diámetro, en cuyo fondo se colocó un disco cubreobjetos de 1 cm. de diámetro tratado con poli-L-lisina en una concentración de 10 mg/ml.

Se permitió que los cultivos crezcan y desarrolle la monocapa por 48 horas. Hasta que se cubra la superficie total de la placa.

Se inoculó con las cepas virales a una concentración de 100 DI₅₀CC.

Las monocapas inoculadas fueron incubadas por 1 hora a 37 ° C, en agitación constante para permitir la adhesión viral. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó el medio de crecimiento, en un volumen de 2.5 ml.

Las monocapas inoculadas se incubaron a 37 ° C y con 5 % de CO₂ por un periodo de 48 a 72 horas, dependiendo de la cepa utilizada, después de lo cual se observaron y evaluaron las monocapas.

Adicionalmente y con el fin de comparar los efectos producidos en las células de las distintas especies, así como el tiempo transcurrido hasta la presentación de estos, se sembraron en placas de 8 pozos células de cornete nasal de alpaca, llama y bovino. Dichas células fueron infectadas con cada una de las cepas virales mencionadas anteriormente y evaluadas 48 – 72 horas post infección para observar los efectos citopáticos característicos.

C.-OBSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LAS MONOCAPAS INOCULADAS.

Para la observación de los cambios citopatogenicos acontecidos en las monocapas celulares como producto de la infección viral, se procedió a la coloración standard de Hematoxilina y Eosina.

Así mismo como técnica de comprobación de la infección de dichos cultivos con los virus correspondientes se realizo la prueba de Inmunofluorescencia Directa, para la detección de antígenos virales.

1.-Determinación de Cambios Citopatogénicos.

Las monocapas fueron evaluadas bajo el microscopio invertido para determinar el porcentaje de la monocapa que presento cambios citopatogénicos.

Adicionalmente, para la evaluación de los cambios citopatogenicos causados por acción de la infección viral en las monocapas, se realizó la

coloración de Hematoxilina Eosina para observar y describir dichos cambios por microscopia óptica.

2.-Detección de antígenos virales.

Se realizó la prueba de Inmunofluorescencia Directa para determinar antígenos virales de: Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV), Parainfluenza 3 (PI-3), Herpes Virus Bovino (VHB-1) y Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) utilizando anticuerpos policlonales específicos marcados con fluoresceína.

Descripción de la prueba de inmunofluorescencia directa (IF)

- Los discos cubre objetos sobre los cuales se cultivaron las células fueron fijados en acetona por 5 minutos, y secados a temperatura ambiente.
- Se procedió a agregar el conjugado correspondiente (anticuerpos policlonales marcados con fluoresceína).
- Cada uno de los discos fue sometido a incubación con 15 ul de antisueros específicos para identificar antígenos virales perteneciente a los virus VRSB, PI-3, VHB-1 y VDVB respectivamente.
- Los discos fueron incubados por 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda, lavados con solución salina de fosfato buffer (PBS) (0.1M, pH 7.2) por 5 minutos, enjuagados con agua bidestilada y secado a medio ambiente.
- El montaje fue realizado agregando 1 gota de líquido de montaje específico. Las lecturas fueron realizadas en microscopio de fluorescencia (marca Leitz-Alemania).

IV. RESULTADOS

Los cultivos celulares secundarios de cornete nasal, piel y testículo de alpaca y llama demostraron alta adaptabilidad al cultivo en las condiciones de laboratorio descritas en Materiales y Métodos, dichos tipos celulares permitieron de 8 a 10 sub pasajes; las células provenientes de riñón, pulmón y bazo tanto de fetos de alpacas como de llamas, mostraron una baja adaptabilidad permitiendo un máximo de 3 pasajes.

Para los ensayos de permisibilidad se escogieron las líneas celulares provenientes de cornete nasal y piel de alpaca y llama debido a que presentaron un mayor crecimiento y homogeneidad de monocapa en comparación con las células de testículo.

Las células de origen en cornete nasal y piel trabajadas muestran permisibilidad a la infección por los virus: VDVB, VHB-1, VRSB y VPI3 (**CUADRO 1**). Mostrando efectos citopatogénicos característicos durante la infección viral. (**CUADRO 2**). Las observaciones fueron basadas en pruebas cualitativas, tales como la presencia de Efecto Citopatogenico (ECP) e Inmunofluorescencia directa (IF) cuyos resultados se muestran en las figuras 2, 3, 4 y 5.

Los efectos citopatogénicos comunes observados fueron: desprendimiento de la monocapa e hipercromatosis, dichos ECP fueron observados en las 4 líneas celulares tras la infección con las 4 cepas. En las células infectadas con el VDVB se observó una clásica vacuolización de citoplasma y núcleo. (**Fig. 5A, 5B y 5C**). En las monocapas infectadas con PI3 y VRSB se observó la presencia de células gigantes multinucleadas (**Fig: 2B, 2C, 4B, y 4D**), así como corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos (**Fig: 2D, 2E**). Los ECP encontrados tras la infección con VHB-1 fueron redondeamiento celular (**Fig: 3C y 3D**) y la presencia de corpúsculos de inclusión intranucleares de tipo Cowdry (**Fig: 3B y 3E**)

Mediante Inmunofluorescencia Directa se confirmó la presencia de antígeno viral en las monocapas celulares inoculadas con las distintas cepas virales (**Fig: 2F, 3F, 4E, 5E y 5F**).

No se encontró diferencia de permisibilidad entre las células provenientes de alpaca, llama y bovino en el ensayo donde se evaluó la permisibilidad de los cultivos secundarios de cornete nasal de estas especies. Los tiempos de presentación de efectos citopatogénicos en los distintos tipos celulares, fueron similares para cada cepa viral trabajada. **(CUADRO 3)**

Cuadro 1. Cepas virales y tipo celular utilizados.

	Cepa viral.	Tipo celular infectado.
VDVB	Singer	Cornete Alpaca
		Piel Alpaca
		Cornete Llama
		Piel Llama
VHB-1	Cooper	Cornete Alpaca
		Piel Alpaca
		Cornete Llama
		Piel Llama
VRSB	Mohanty	Cornete Alpaca
		Piel Alpaca
		Cornete Llama
		Piel Llama
VPI-3	SF-4	Cornete Alpaca
		Piel Alpaca
		Cornete Llama
		Piel Llama

Cuadro 2. Caracterización de ECP en cultivos celulares.

Cepa viral inoculada	Tipo de cultivo celular	Tipo de efecto citopatogénico	Resultado de IF
VDVB	Cornete Alpaca	Desprendimiento de monocapa, hipercromatosis, vacuolización del citoplasma, vacuolización del núcleo, tumefacción celular.	Positivo
	Piel Alpaca		
	Cornete Llama		
	Piel Llama		
VHB-1	Cornete Alpaca	Desprendimiento de monocapa, hipercromatosis, tumefacción celular, agregados celulares, corpúsculos de inclusión intranucleares	Positivo
	Piel Alpaca		
	Cornete Llama		
	Piel Llama		
VRSB	Cornete Alpaca	Desprendimiento de monocapa, Hipercromatosis, Formación de sincitios, Inclusiones intracitoplasmáticas,	Positivo
	Piel Alpaca		
	Cornete Llama		
	Piel Llama		
VPI-3	Cornete Alpaca	Desprendimiento de monocapas, hipercromatosis, tumefacción celular, vacuolización citoplasma, corpúsculos de inclusión intracitoplasmáticos	Positivo
	Piel Alpaca		
	Cornete Llama		
	Piel Llama		

Cuadro 3. Tiempo transcurrido a la presentación de ECP según tipo celular.

Cepa viral inoculada.	Tipos celulares infectados	Tiempo transcurrido a la presentación de ECP
VDVB	Cornete nasal de alpaca.	48-52 h.p.i.
	Cornete nasal de llama.	
	Cornete nasal de bovino.	
VHB-1	Cornete nasal de alpaca.	20-24 h.p.i.
	Cornete nasal de llama.	
	Cornete nasal de bovino.	
VRSB	Cornete nasal de alpaca.	36-40 h.p.i.
	Cornete nasal de llama.	
	Cornete nasal de bovino.	
VPI-3	Cornete nasal de alpaca.	36-40 h.p.i
	Cornete nasal de llama.	
	Cornete nasal de bovino.	

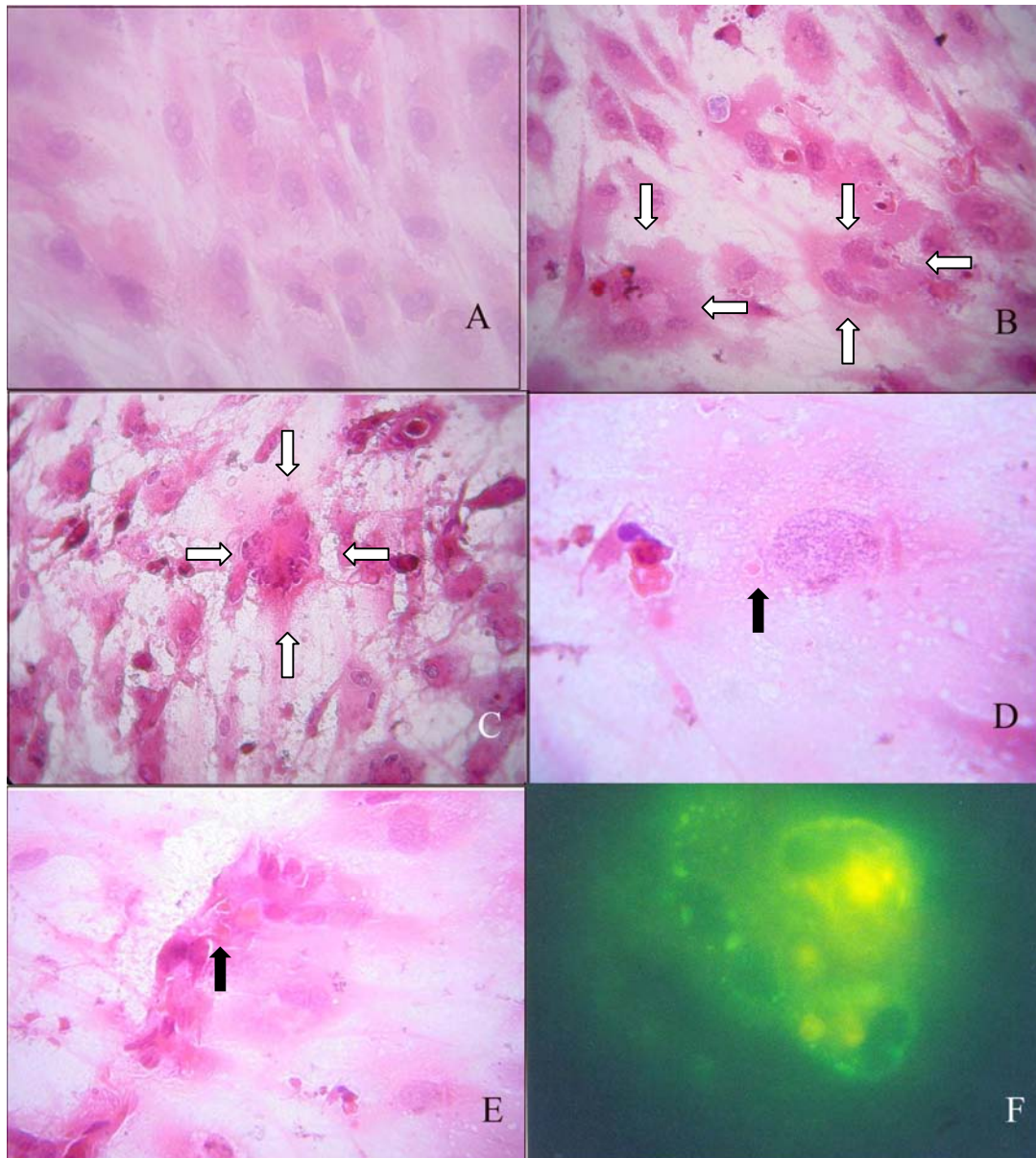


Figura 2.- Células infectadas con Virus Parainfluenza Bovina 3. Monocapa de cornete nasal utilizada como control, sin ECP (A)(H-E, 400X). Células de cornete nasal de llama mostrando sincitios celulares (⇔)(B y C)(H-E, 400X). Presencia de corpúsculos intracitoplasmáticos acidófilos (➡) (D y E)(H-E, 1000X), y células hiperclomáticas redondeadas con desprendimiento celular en la monocapa (C). Demostración de antígenos virales por Inmunofluorescencia.(E)(1000X).

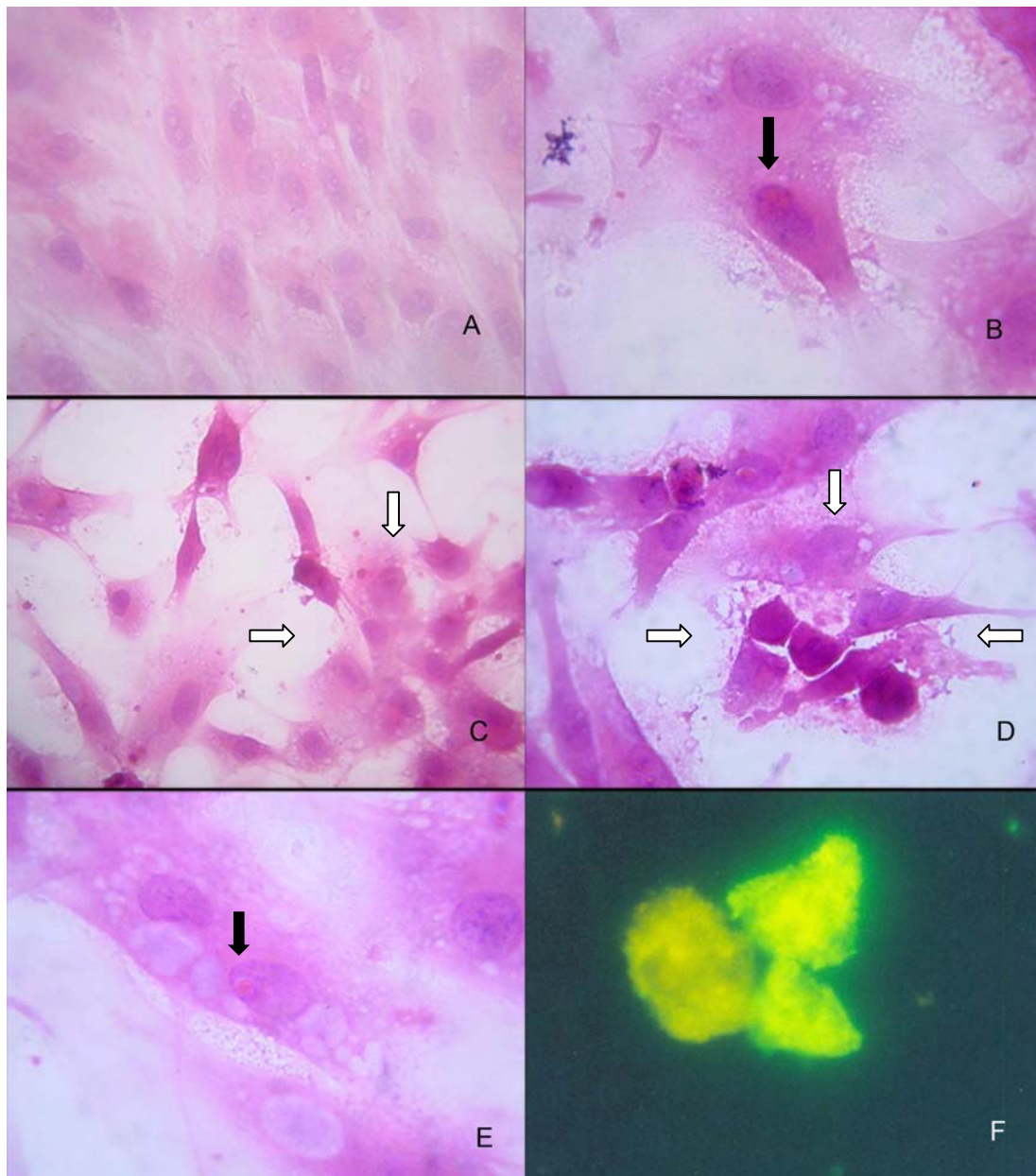


Figura 3. Células infectadas con Herpesvirus Bovino tipo 1. Células de cornete nasal de llama usadas como control, ausencia de ECP (A)(H-E, 400X). Corpúsculo intranuclear acidófilo (➡)(B, E)(H-E, 1000X). Erosión de la monocapa y redondeamiento celular (⇨) (C, D, E). Demostración de antígeno viral por Inmunofluorescencia.(F)(1000X).

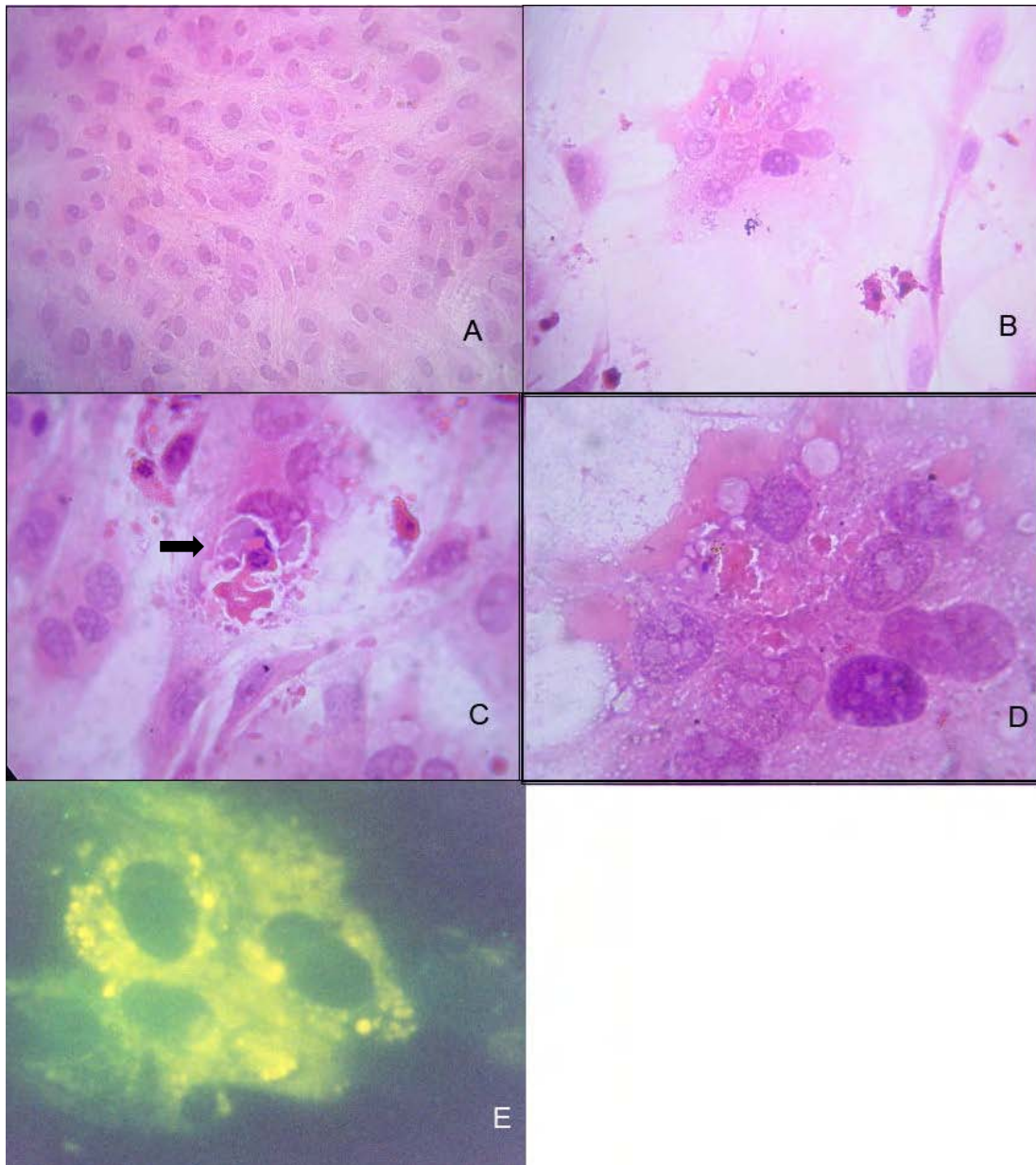


Figura 4. Células infectadas con Virus respiratorio Sincitial Bovino. Células de piel de alpaca utilizadas como control (A)(H-E, 100X). Formación de sincitios celulares. (B, D)(H-E, 400X y 1000X) Erosión de la monocapa y cariorexis (➡)(C)(H-E, 1000X). Demostración de antígenos virales por Inmunofluorescencia (E)(1000X).

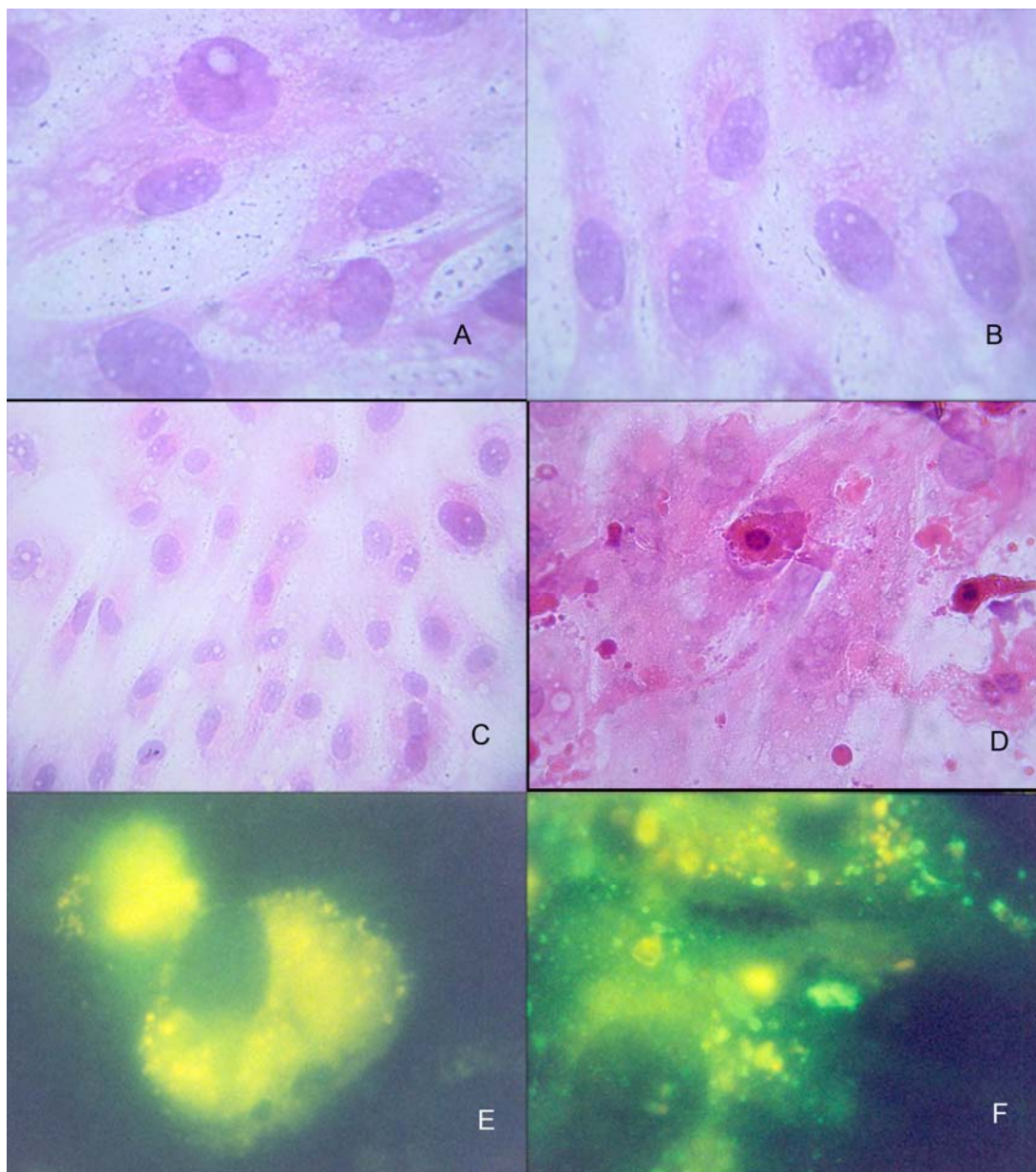


Figura 5. Células infectadas con Virus de la Diarrea Viral Bovina. Células presentando degeneración y vacuolas citoplasmáticas y nucleares (A, B, C)(H-E, 1000X y 400X). Erosión de la monocapa y redondeamiento celular (D)(H-E, 1000X). Demostración de antígenos virales por Inmunofluorescencia (E, F)(1000X).

V. DISCUSIÓN

En el sistema productivo típico en la sierra peruana, la crianza de CSA conjuntamente con ganado de origen europeo, plantea una situación muy particular, pues siendo conocida la habilidad de ciertos virus de utilizar mas de una especie en su cadena epidemiológica (Manchego, 1998), la situación de dichos sistemas productivos deja abierta la posibilidad de que la salud de los CSA sea afectada por agentes provenientes del ganado de origen europeo.

Es conocido que dentro de la casuística de enfermedades que afectan a los CSA, las principales entidades que afectan con pérdidas debido a su alta morbilidad y mortalidad, son las respiratorias y reproductivas (Ameghino, 1990; Ramírez, 1991). En la explotación ganadera mundial, es muy alto el porcentaje de cuadros de este tipo causados por agentes virales; en CSA el conocimiento de enfermedades virales es escaso, y no se conoce la prevalencia, epidemiología y patogenia de estos cuadros (Bustinza, 2000).

Mediante el presente estudio se demostró que las células de cornete nasal y piel obtenidas de las especies domésticas de CSA y cultivadas *in vitro*, pueden ser infectadas por 4 cepas virales de conocida prevalencia y rol etiológico en el ganado de origen europeo, el Virus de la Diarrea Viral Bovina, el Herpesvirus bovino tipo 1, el Virus Respiratorio Sincitial Bovino y el Virus Parainfluenza 3 Bovino; se caracterizaron además algunos efectos citopatogénicos causados por estos virus y que guardan relación con aquellos observados en células bovinas cultivadas *in vitro*.

En los ensayos realizados, se demostró la adaptabilidad a las condiciones de cultivo *in vitro* de las células provenientes de cornete nasal, piel y testículo de fetos de llama y alpaca. Las células provenientes de cornete nasal y piel fueron elegidas para los ensayos de permisibilidad debido a que guardan más homología con los tipos celulares infectados *in vivo* por las cepas virales estudiadas. Por otra parte, no se pudieron establecer cultivos celulares secundarios de riñón, pulmón ni bazo. La diferencia en la viabilidad de dichos tipos celulares puede ser resultado de la técnica utilizada para obtener los cultivos primarios; si bien la técnica del

Explanter Primario es una técnica ampliamente utilizada para la obtención de células de tejidos de origen epitelial, esta es altamente selectiva (Freshney, 1987) y podría no ser apropiada para algunos tipos celulares como los mencionados anteriormente.

En la infección viral, el proceso fundamental es la expresión del ciclo replicativo del virus en una célula huésped (Brooks, *et al.*; 1999). La adhesión y penetración, como primer paso para la replicación viral, requiere la unión del virus a la superficie celular. Una proteína o glicoproteína de la superficie viral reconoce receptores específicos de la superficie celular. La presencia o ausencia de estos receptores celulares determinan el rango de hospederos así como los órganos blanco dentro de cada hospedero (Restrepo, *et al.*; 2004).

Los virus lesionan las células del huésped al entrar en la célula y replicarse a expensas del huésped. El tropismo viral, se debe en parte a la especificidad de receptores virales como celulares, pero además el tropismo celular es causado por la capacidad del virus para replicarse en el interior de algunas células y no en otras. En el presente estudio se demostró no solo que es posible la adherencia y unión del virus a la célula, si no también el proceso de replicación completo como evidencia la presentación de efectos citopatogénicos (ECP) característicos (Brooks, *et al.*; 1999) y detallados en este trabajo.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, las cepas virales trabajadas utilizarían vías de adherencia y penetración homologas a las utilizadas en las células de origen bovino. Las células cultivadas *in vitro* de llama y alpaca, presentarían receptores homólogos a aquellos presentes en células bovinas. La exacta naturaleza de estos receptores debería ser esclarecida en posteriores estudios.

Para la adherencia del VDVB es necesaria la unión de la proteína E2 con el receptor CD46 bovino (Maurer, 2004). Además, se ha propuesto que la unión de la proteína viral E^{rns} a las células es mediante la interacción con glucosaminoglicanos como el Heparan Sulfato y que el VDVB podría unirse inicialmente a las células por este mecanismo. Esto sugiere que la infección celular por VDVB puede ser dependiente de un proceso de pasos múltiples en el cual la unión del virus a las

células y la internalización son dos pasos distintos que requieren dos receptores celulares distintos (Hulst, 1997; Iqbal, 2000). Este virus ha podido ser adaptado a muchos tipos celulares provenientes de distintas especies animales y parece que su receptor tiene amplia distribución en diversas células, por ejemplo la línea celular MDBK, proveniente de células de riñón bovino; en líneas celulares de riñón de ternero JCK, células pulmonares de embrión bovino BEL, cultivos primarios de cornete nasal BT (Deregt *et al.*, 2004; Makoschey *et al.*, 2004). La gran adaptabilidad de este virus a distintos tipos celulares constituye también un gran problema de contaminación, originada en los sueros fetales bovinos utilizados ampliamente en la industria de cultivos celulares..

El VHB-1 requiere la unión de las proteínas de envoltura gB y gC con receptores celulares del tipo Heparan Sulfato (Li *et al.*, 1996). Los datos disponibles a la fecha sugieren que la unión de los herpesvirus a la mayoría de células permisivas es un evento complejo que involucra la unión de la proteína gC al receptor celular Heparan sulfato y la gD a otro receptor aun no definido (Iqbal, 2000; Li, 1995). El VHB-1 es capaz de infectar células epiteliales del tracto respiratorio alto, mucosa vaginal y prepucial, tonsilas, conjuntivas, además de linfocitos T CD-4, monocitos y macrófagos (Lovato, 2003).

La glicoproteína G del VRSB es la proteína de unión, que hace posible la adherencia a la célula al unirse a glucosaminoglicanos de la superficie celular; la glicoproteína F es responsable de la penetración a la célula huésped (Schlender *et al.*, 2003).

En la replicación del VPI-3 la proteína HN se une a residuos de ácido N-acetylneuraminico (ácido siálico) presentes en glicoconjugados de la superficie celular, además, sialoglicoproteínas y glicolípidos también facilitarían la unión del virus. La proteína HN contribuye además al proceso mediante el cual la proteína F produce la fusión de la envoltura viral a la membrana celular (Porotto, *et al.*, 2004; Suzuki, *et al.*, 2001; Zhang, 2005).

En una célula permisible a infección viral, la respuesta a esa infección puede ser la citopatología celular con la muerte consecuente. Estos distintos efectos citopatogénicos son resultado de alteración a distintos niveles celulares

como: efecto sobre la síntesis de macromoléculas, alteración de lisosomas, alteración de la membrana celular, características todas que indican la toma de la maquinaria celular por el virus en pos de su replicación (Mandell, 2005).

La tumefacción o hinchazón celular es la primera manifestación de casi todas las formas de lesión celular. Desde el punto de vista microscópico se pueden observar pequeñas vacuolas claras en el citoplasma; estas vacuolas representan segmentos distendidos del retículo endoplasmático, como se observa claramente en las células infectadas por VDVB. La tumefacción celular aparece siempre que las células son incapaces de mantener su homeostasis de iones y fluidos, como ocurre en una célula cuya membrana ha sido dañada por virus. La inserción de proteínas virales en la membrana plasmática de las células huésped lesiona directamente su integridad o favorecen la fusión celular (Cotran, 2000).

La necrosis manifestada en las monocapas infectadas, son resultado de dos procesos concurrentes, la digestión enzimática de la célula y la desnaturalización de las proteínas. Las enzimas catalíticas proceden de los lisosomas de las células muertas, lo que en este caso constituye una digestión enzimática autolítica. Las células necróticas muestran un aumento de la eosinofilia, atribuible en parte a la pérdida de la basofilia normal proporcionada por el ARN en el citoplasma y, en parte, al aumento de la unión de la eosina a las proteínas intracelulares desnaturalizadas. La célula puede tener un aspecto esmerilado más homogéneo que las células normales, principalmente como resultado de la pérdida de partículas de glucógeno. Cuando las enzimas han digerido las organelas del citoplasma, el citoplasma también se vacuoliza y adopta un aspecto característico. Las células necróticas se caracterizan por una discontinuidad de las membranas plasmáticas y de las organelas. Los cambios nucleares se manifiestan como picnosis, caracterizada por constricción nuclear y aumento de la basofilia. Aquí el ADN se condensa aparentemente en una masa basofila encogida y sólida. Este patrón coincide con el de necrosis coagulativa, ya que se preserva el perfil básico de la célula (Cotran, 2000).

Los mecanismos por los cuales los virus destruyen las células infectadas son diversos, teniendo cada uno su mecanismo de replicación propio según sus

características génicas; la inhibición del ADN, ARN o la síntesis proteica en las células huésped es uno de los mas importantes (Cotran, 2000), esto contribuye a la presentación de ECP característicos según el virus que infecta un cultivo celular dado.

La rápida replicación viral causa lisis celular de las células huésped. Como se observó en el caso de VHB-1, cepa viral de rápida replicación que presento una erosión de la monocapa observable al microscopio de inversión, y coincide con lo mencionado por Mandell (2005).

In vitro, las cepas citopáticas de VDVB inducen clásicamente vacuolización y muerte celular (Grummer, 2001); ambos efectos citopatogénicos fueron observados en los ensayos realizados en células de piel y cornete nasal de llama y alpaca. Los estudios sugieren que el VDVB es liberado por gemación dentro de la cisterna del retículo endoplasmático, luego ocurre una maduración en el aparato de Golgi y la salida del virus por exocitosis o lisis celular, como mecanismo alternativo a la gemación por la membrana celular presentado por otros virus (Grummer, 2001) El daño a las membranas del Retículo Endoplasmático es observable al microscopio óptico como una extensa vacuolización del citoplasma.

La replicación primaria del VHB-1 tiene lugar en el núcleo de las células y se completa por el agregado de cubiertas proteicas a medida que el virus atraviesa la membrana nuclear. La replicación viral completa se asocia con la lisis de la célula infectada (Mandell, 2005). Entre los ECP se observaron la formación de células multinucleadas con degeneración por tumefacción, edema pronunciado y la presencia de inclusiones intranucleares tipo Cowdry características a la infección por Herpesvirus (Mandell, 2005). Adicionalmente, la literatura menciona la aparición de vacuolas en el espacio perinuclear, como producto de la liberación de las cápsides ya envueltas desde el núcleo. Los efectos citopatogénicos aparecieron con rapidez, en el curso de 24 a 48 horas. Las células se tornaron redondeadas y aglomeraron con una rápida progresión de efectos citopatogénicos a través de toda la capa celular.

La presencia del VRSB en cultivos de células infectadas se detecta por su aspecto sincitial característico, el grado de formación de este depende del tipo de

cultivo celular, el medio y la cepa viral (Rosado, 2006). El efecto citopatogénico puede presentarse entre 3 a 7 días (Mandell, 2005). El efecto citopatogénico predominante en las monocapas de este experimento fue un redondeo inicial de las células seguido por formación de sincitios alrededor de los 3 dpi.

Cuando el virus Parainfluenza infecta la célula, los primeros cambios morfológicos observables incluyen redondeamiento focal y aumento del tamaño de citoplasma y núcleo. Otros cambios que pueden ser observados incluyen vacuolas citoplasmáticas únicas o multiloculares, inclusiones basofílicas o eosinofílicas y la formación de células gigantes multinucleadas. Estas células gigantes generalmente aparecen en etapas tardías de la infección y contienen entre 2 a 7 núcleos (Henrickson, 2003).

Los hallazgos conseguidos en el presente estudio indican que estos virus pueden desarrollar una infección productiva en los cultivos celulares provenientes de alpacas y llamas, pudiendo ser potenciales agentes patógenos y producir cuadros neumónicos y/o abortivos como lo producen en el ganado europeo.

Adicionalmente, los estudios serológicos han demostrado la continua exposición de los CSA a dichos agentes virales. Se han reportado seroprevalencias de: 14% (Manchego, *et al.*, 1998) y 12 % (Alvarez, *et al.*, 2002) para VDVB en alpacas de Arequipa y Cusco respectivamente; para HVB-1, Manchego (1998) reportó un 18% de Alpacas y 17% de Llamas en Arequipa, y Victorio (2004) encontró un 80% de alpacas rectoras en Cusco.; para VRSB, Manchego (1998) en una comunidad de Arequipa reportó el 9 % de alpacas positivas, mientras que Victorio (2004) encontró un 80.2 % en alpacas de la provincia de Canchis en el Cusco. En llamas de dos empresas ganaderas del departamento de Puno se obtuvieron 20 y 26 %, mientras que en tres comunidades del mismo departamento se obtuvieron prevalencias de 5.2%, 25% y 22 % respectivamente (Rivera, *et al.*, 1990); para VPI3, la prevalencia encontrada en llamas fue de 28 a 54% en animales de empresas asociativas y de 27 a 75% en tres comunidades campesinas (Rivera, *et al.*, 1990) mientras que en una comunidad de Arequipa, el 66% de alpacas fueron positivas (Manchego, *et al.*, 1998) y Victorio (2004) encontró una prevalencia de 67.6% de alpacas

seropositivas. Estos datos serológicos demuestran la presencia de dichos agentes virales en las poblaciones de CSA, presentando una dinámica de infección en animales susceptibles. Dichos datos aunados a los obtenidos en el presente estudio terminarían de demostrar el potencial patógeno de dichos virus en las poblaciones de CSA.

Si bien es cierto, los datos obtenidos de modelos experimentales *in vitro* deben ser extrapolados cuidadosamente con lo que ocurriría en un sistema *in vivo*, los resultados obtenidos en el presente estudio son importantes para identificar las interacciones virus - hospedero iniciales necesarias para la infección por VDVB, VHB-1, VRSB y VPI3. El conocimiento de la patología de las infecciones virales en CSA podría ser útil para el efectivo control y tratamiento de las enfermedades virales que afectan al ganado altoandino.

VI. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Los cultivos celulares secundarios de cornete nasal, piel y testículo de alpacas y llamas son viables y constituyen un modelo apropiado para ensayos de replicación viral.
- Las células secundarias de cornete nasal y piel de alpaca y llama son permisibles a la multiplicación viral de VDVB, PI3, HVB-1, VRSB; lo que sugiere la presencia de receptores celulares similares u homólogos a los presentados en células bovinas.
- Las células de llamas, alpacas y bovino, reaccionan de igual manera con la presentación de ECP tras la infección con VDVB, VHB-1, VRSB y VPI3. Encontrándose similitudes tanto en la naturaleza de dichos efectos, como en el tiempo de presentación de los mismos.

VII. LITERATURA CITADA

- Álvarez, S; Rivera, H,; Pezo, D. 2002. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. Rev.Inv.Vet.Peru 2002; 13(1):46-51
- Ameghino, E. 1990. Neumonías. En: Avances sobre investigación en salud animal. Camélidos sudamericanos. IVITA. Bol Div, 23: 25-31.
- Babiuk, L., van Drunen Littel-van den Hurk, S. y Tikoo, S. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. Vet Microbiol. 53: 31-42
- Baker, J. 1987. Bovine Viral Diarrhea Virus: A Review. JAVMA, 190 (11): 1449-1458.
- Baker, J. 1995. The clinical manifestations of Bovine Viral Diarrhea infection. Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract, 11 (3): 425-445.
- Bolin, S. 1990. The Current understanding about the patogenesis and clinical forms of BVD. Symposium on BVD. Vet Med, p. 2-8.
- Brooks, G; Butel, J; Morese, S. 1999. Microbiologia Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16^a Ed. Manuel Moderno. Mexico DF. Mexico.
- Bustinza, J. 2000. Enfermedades de Alpacas. 2da Edición. UNA. Perú.
- Carter, G; Wise,D; Flores,E.2005. Herpesviridae. En: A concise review of veterinary virology. International Veterinary Informatin Service. Ithaca, NY.

- Cotran, R; Kumar, V; Colins, T. 2000. Patología estructural y Funcional. 6ª Ed. Mc Graw- Hill- Interamericana. España.
- Cristina, J; Yunus, A; Rockermann, D; Samal, S. 2001. Bovine respiratory syncytial virus can induce apoptosis in MDBK cultured cells. Veterinary Microbiology, 83(4): 317-320.
- Delhon, G; González, M; Murcia, P.2002. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. Journal of General Virology. 83: 2257-2267.
- Deregt, D; Jacobs, R; Carmanc, P; Tessaro, S. 2004. Attenuation of a virulent type 2 bovine viral diarrhea virus. Veterinary Microbiology 100 :151-161.
- Dirksen, G; Grunder, H. 2005. Medicina Interna y Cirugía del Bovino. 4ta Ed. Intermedica. Buenos Aires. Argentina.
- Engels, M.; M. Ackermann. 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. Vet. Microbiol. 53: 3-15.
- Flores, E. 2003. Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral Diarrhea virus type 2 isolates: evidence of a subgenotype within BVDV 2. Virus Res. (2003) 00:000
- Franki, R; Fauquet, C; Knudson, D; Brown, F.1991. Classification and nomenclature of viruses; Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. 1991; Suppl 2: 223-233.

- Fulton, R; Ridpath, J; Ore, S. 2005. Bovine viral Diarrhea virus (BVDV) subgenotypes in diagnostic laboratory accessions; Distribution of BVDV1a, 1b and 2a subgenotypes. *Veterinary Microbiology* 111 :35-40.
- Grummer, B; Beer, M; Liebler-Tenorio, E; Greiser-Wilke, I. 2001. *Journal of General Virology* , 82, 2597-2605.
- Hanon, E; et al. 1999. Bovine Herpesvirus 1 induced apoptotic cell death: Role of glycoprotein D. *Virology* 257: 191-197.
- Henrickson, K. 2003. Parainfluenza Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*,, p. 242-264, Vol. 16, No. 2
- Houe, H. 1995. Epidemiology of Bovine Viral Diarrhea Virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 11(3): 521-547.
- Hulst, M; Moormann, R. 1997. Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins Erns and E2 of classical swine fever virus: Erns and E2. *Journal of General Virology* , 78, 2779–2787
- Iqbal, M; Flick- Smith, H; Mc Cauley, J. 2000. Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein Erns with cell surface glycosaminoglycans. *Journal of General Virology* (2000), 81, 451-459.
- Iqbal, M; Poole, E; Goodbourn, S; Mc Cauley, J. 2004. Role for Bovine Viral Diarrhea Virus E^{rn}s Glycoprotein in the Control of Activation of Beta Interferon by Double-Stranded RNA . *Journal of Virology*, p. 136-145, Vol. 78, No. 1

- Karger, A; Schmidt, U; Buchholz, U. 2001. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *Journal of general Virology* 82:631-640.
- Khattar, S; Yunus, A; Collins, P; Samal, S. 2001. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription RNA replicaton and interaction with the nucleoprotein. *Virology*, 285(5): 253-269.
- Li Y.1996. Structural and funcnional study of bovine herpesvirus 1 glycoprotein B in the interaction with Madin Darby bovine kidney cells. Thesis to Doctor of Philosophy. Dep. Veterinary Microbiology. Univ. of Saskatchewan. Canadá. p 267
- Li, Y; Van Drunen Littel, S; Babiuk, L; Liang, X. 1995. Characterization of Cell-Binding Properties of Bovine Herpesvirus 1 Glycoproteins B, C, and D: Identification of a Dual Cell-Binding Function of gB. *Journal of virology*,, p.4758–4768 Vol. 69, No. 8.
- Larsen, L. 2000. Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV): a review. *Acta Veterinaria Scandinavia*. 41(1) 1-24.
- Lazar, C; Zitzmann, R; Dwek, N; Branza-Nichita, N. 2003. The pestivirus Erns glycoprotein interacts with E2 in both infected cells and mature virions. *Virology* 314:696–705.
- Loken, T.1995. Ruminant pestivirus infections in other animals. *Vet. Clin. N. Am.Food An. Pract* .1995; 11: 597-614.
- Lovato, L; Inman, M; Henderson, G; Doster, A; Jones, C. 2003. Infection of Cattle with a bovine hrepesvirus 1 strain that contains a mutation in the

latency – related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *Journal of Virology* 77: 4848 - 4857

- Manchego, A.; Rivera, H.; Rosadio, R. 1998. Seroprevalencia de enfermedades virales e un rebaño mixto de una comunidad alpaquera altoandina de la región Arequipa. *Revista de investigación Pecuaria IVITA* 9; (2) Lima, Perú. Pag 1-10.
- Mandell, G.L; Bennett, J.E; Dolin, R. 2005. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*. 6ta ed. Elsevier. España.
- Masot, A; et al. 2000. In Situ Hybridization Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in the lung of experimentally infected lambs. *Veterinary Pathology*. 37:618-625.
- Makoschey, B; Becher, P; Janssen, M; 2004. Bovine viral diarrhea virus with deletion in the 5' nontranslated region : reduction of replication in calves and induction of protective immunity. *Vaccine* 22 :3285-3294
- Maurer, K; Krey, T; Moennig, V; Thiel, J; Rumenapf, T.. 2004. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* 78:1792–1799.
- Meyer, G; et al. 1998. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *Journal of General Virology*. 79: 1983-1987.
- McGowan, M; Kirkland, P. 1995. Early Reproductive loss due to bovine pestivirus infection. *Br Vet J*, 151: 263-279.

- Moenning, V; Eicken, K; Flebbe, U. 2005. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhea (BVD) Preventive Veterinary Medicine 72 :109 – 114.
- Novoa C; Leyva, V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Publ. Cient. IVITA, 26:1-2.
- Ogilvie, T.H. ; 1990. Large Animal Internal Medicine. Williams and Wilkins. 1a ed. Inglaterra.
- OGTR. 2005. The biology of Bovine Herpesvirus 1. Australian Government. Departament of Health and Ageing. Office of the gene Technology Regulator. Disponible en:
www.ogtr.gov.au/pdf/ir/biologybovineherpesvirus.pdf
- Peterhans, E; Jungi, T; Scheizer, M. 2003. BVD and innate immunity. Biologicals 31 :107-111.
- Pidone, C., Galosi, M. y Etcheverrigaray, M. 1999. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. Analecta Veterinaria (Argentina). 19: 40-50
- Porotto, M; Murrell, M; Greengard, O; Lawrence, M; MCKimm, J; Moscona, A. 2004. Inhibition of Parainfluenza Virus Type 3 and Newcastle Disease Virus Hemagglutinin-Neuraminidase Receptor Binding: Effect of Receptor Avidity and Steric Hindrance at the Inhibitor Binding Sites. Journal of Virology, p. 13911-13919, Vol. 78, No. 24
- Qu, L; Mc Mullan, L; Rice, C. 2001. Isolation and Characterization of Noncytopathic Pestivirus Mutants Reveals a Role for Nonstructural Protein NS4B in Viral Cytopathogenicity. Journal of Virology, p. 10651-10662, Vol. 75, No. 22.

- Radostits, O.; Bay, C.; Blood, D. Hinchcliff, K. 2002. Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. 9ª ed. Editorial MacGraw Hill Interamericana. Vol. II. Pags: 1390-1403.
- Ramírez, A. 1991. Enfermedades infecciosas. En: Fernández-Baca, Avances y Perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago Chile. Pág.:265,323.
- Rebhun, W.C.; 1995. Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero. Acribia. Zaragoza. España.
- Reina, M. 2003. Técnicas de estudio de líneas celulares. Universidad de Barcelona. Disponible en:
www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/tecnicas_de_cultivo_celular.htm
- Restrepo, A; Robledo, J; Leiderman, E; Restrepo, M; Botero, D; Bedoya, I. 2004. Enfermedades Infecciosas. 6 a Ed. Corporacion para Investigaciones Biologicas. Medellin. Colombia.
- Richey, E. 1994. IBR in beef cattle (Infectious bovine rhinotracheitis/red nose). VM-55. University of Florida, Institute of Food And Agricultural Sciences.
- Richey, E. 2002. Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) and Parainfluenza 3 (PI-3). VM 64. University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Ridpath, J. 2003. BVDV genotypes and biotypes: Practical implications for diagnosis and control. Biologicals 31 (2003) 127-131.

- Ridpath, J; Neil, J; Vilcek, S. 2005. Multiple outbreaks of severe acute BVDV in North America occurring between 1993 and 1995 linked to the same BVDV2 strain. *Veterinary Microbiology* 114 (3-4): 196 - 204
- Risco, V; Rivera, H.; Pezo, D.; Garcia, W.; Rosadio, R. 1998. Detección de anticuerpos y virus de la diarrea viral bovina en alpacas durante una campaña reproductiva. *Rev. de Investigaciones Pecuarias* 1998;9(2):59-64
- Rivera, H; Madewell, B. y Ameghino, R; 1987a. Serologic survey of viral antibodies in the peruvian alpaca (*Lama pacos*). *Am J Vet Res Vet*, 48 (2): 189-191.
- Rivera, H; Andresen, H y Levano, J. 1987b. Prevalencia de anticuerpos a Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Parainfluenza 3 (PI3) y Enfermedad Respiratoria Sincitial (RSV) en bovinos de Lima. Libro Resúmenes IX Congreso de Ciencias Veterinarias, Julio, Cajamarca, Peru. Pag. 18.
- Rivera, H.; Madewell, B.; Ameghino, E. 1990. Estudio serológico de anticuerpos virales en llamas. *IVITA-UNMSM. Bol. Div.* 23:58:59.
- Rivera, H; Manchego, A; Sandoval, N.1993. Aborto infeccioso en bovinos de leche del valle de Lima. *Rev. Inv. Pec IVITA (Perú)*, 6(1): 31-37.
- Rivera, H; Manchego, A; Sandoval, N; et al., 1994. Complejo respiratorio bovino en terneros del valle de Lima. *Rev Inv Pec IVITA (Perú)*, 7(1): 35-38.
- Rosadio, RH; Evermann, SF y De Martini, JC. 1984. A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Vet Microbiol*, 10: 91-96.

- Rosadio, R; Rivera, H; y Manchego, A. 1993. Prevalence of neutralising antibodies to bovine herpesvirus-1 in peruvian livestock. *Vet. Rec.* 132:611-612.
- Rosado, F; Servan, R; Campalans, J; Weis, C. 2006. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virological Methods.* 131: 130-133.
- Samal, S; Pastey, M. 1997. Role of envelope glycoproteins of bovine respiratory syncytial virus in cell fusion. *Indian Journal of Biochemistry and biophysics.* 34:181-185.
- Sánchez, G; Benito, A; Rivera, H. 2003. Seroprevalencia del Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en Ganado Lechero del Valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 14(1):54-6.
- Schlender, J; Zimmer, G; Herrler, G; Conzelman, K. 2003. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. *Journal of Virology.* 77: 4609-4616.
- Searl, R. 1998. Infectious Bovine Rhinotracheitis. En: *Beef Cattle Handbook.* Beef Cattle Resource Comittee. University of Winsconsin.
- Silflow, R; Degel, P; Harmsen, A. 2005. Bronchoalveolar immune defense in cattle exposed to primary and secondary challenge with bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1003 :129-139.
- Smith, B. 1990. *Large Animal Internal Medicine.* 1 ed. Mosby Company. Toronto.Canada.

- Stalder, H; Meier, P; Pfaffen, G. 2005. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. Preventive veterinary Medicine 72 :37-41
- Suzuki, T; Portner, A; Scroggs, R; Uchikawa, M; Koyama, N; Matsuo, K; Suzuki, Y; Takimoto, T. 2001. Receptor Specificities of Human Respiroviruses . Journal of Virology, p. 4604-4613, Vol. 75, No. 10
- Tautz, N; Meyers, G; Thiel, H. 1998. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. Clinical and Diagnostic Virology. 10 :121-127.
- Wheeler, J.2003.Evolution and origin of the domestic camelids.Int. Lama Reg. Rep. 8:2
- Winkler, M.; A. Doster; C. Jones. 2000. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. J. Virol. 74: 5337-5346.
- Wisel, D; Carter, G., Flores, E. 2005.Cultivation and Characterization of viruses. En : A concyse review of veterinary virology.International Veterinary Information Service. Ithaca, New York.Disponible en: www.ivis.org
- Valarcher, J; Furze, J; Wyld, S. 2003. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. Journal of Virology 77: 8426-8439.
- Valentova, V; Psikal, I; Kovarcik, K. 2003. Demosntration of bovine respiratory syncytial virus RNA in peropheral blood leukocytes of naturally infected cattle. Acta Virologica 47: 33-36.
- Victorio, W; Rosadio, R.; Rivera, H.; Manchego, A. 2004. Seroprevalencia de los virus neumopatogenos de la Parainfluenza Bovina (VPI3),

Herpesvirus Bovino (HVB) y Virus respiratorio Sincitial Bovino (VRSB) en alpacas adultas de la provincia de Canchis-Cusco. *Rev. investig. vet. Perú*, jul./dic 2004, vol.15, no.2, p.127-131.

- Vilceck, S; Durkovic, B; Kolesarova, M. 2005. Genetic diversity of BVDV: Consequences for classification and molecular epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* 72:31-35.
- Villacaqui, E.; Rivera, H.; Manchego, A. 2005. Seroprevalencia del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (vRIB) en bovinos de crianza extensiva de tres distritos de la provincia de San Pablo (San Pablo, Tumbaden y San Bernardino), Departamento de Cajamarca. Tesis Bachiller. Fac. Med. Vet UNMSM. Lima.
- Zacarías, E; Benito, A; Rivera, H.2002. Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa en bovinos criollos de Parinacochas, Ayacucho. *Rev. Inv. Vet. Perú*.13(2)
- Zanabria, V; Rivera, H; Rosadio, R. 2000. Etiología del síndrome neumónico agudo en vacunos de engorde de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2000; 11(2):169-187
- Zhang, L; bukreyev, A; thompson, C; Watson, B; Peeples, M; Collins, P; Pickles, R. 2005. Infection of Ciliated Cells by Human Parainfluenza Virus Type 3 in an In Vitro Model of Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*, p. 1113-1124, Vol. 79, No. 2